

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Avaliação da extensão do tempo de prateleira de tomates cereja  
irradiados por feixe de electrões**

Andreia Filipa Povoeira Severino

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**

Dissertação orientado por:  
Prof. Maria Manuela Carolino e Doutora Sandra Cabo Verde

2018

## Agradecimentos

Quero agradecer, principalmente, à Doutora Sandra Cabo Verde, pois sem ela este trabalho não teria sido possível, pela sua orientação, disponibilidade, pelo apoio durante estes meses no laboratório, por me ter deixado integrar neste projeto. Agradeço também às pessoas que trabalham no laboratório, à Joana Madureira que me ajudaram sempre que precisei.

Agradeço à minha orientadora Maria Manuela Spratley Saraiva de Lemos Carolino, por ter aceite o meu tema de estágio e por toda a ajuda oferecida.

Quero agradecer aos meus pais, por me terem dado esta oportunidade, pois sem eles nada disto teria sido possível, às minhas amigas e ao meu namorado por me terem apoiado sempre que precisei, e pelo empurrão que deram nesta fase final.

E, por fim, agradeço à Universidade de Lisboa, nomeadamente à Faculdade de Ciências, ao Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas (LETAL) e Instalação de Radiações Ionizantes (IRIS) do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C2TN) do Instituto Superior Técnico, pelas condições disponibilizadas para que eu pudesse atingir este meu objetivo.

# Índice

Agradecimentos.....	ii
Índice de Figuras .....	iv
Índice de Tabelas.....	v
Abreviaturas.....	vi
Unidades.....	vii
Resumo.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Irradiação por feixe de electrões.....	1
1.1.1 Mecanismos de inactivação microbiana por radiação ionizante .....	2
1.1.2 Legislação e comercialização na União Europeia .....	4
1.1.3 Aplicações da irradiação de alimentos .....	5
1.2 Consumo de alimentos frescos .....	5
1.3 Tomate.....	6
1.3.1 Tomate Cereja .....	7
2. Problemática.....	8
3. Objectivos.....	9
4. Metodologia.....	10
4.1. Irradiação das amostras .....	10
4.2. Estudos de inactivação por feixe de electrões da microbiota natural .....	10
4.3. Estudos de inactivação por feixe de electrões de microrganismos potencialmente patogénico .....	11
4.4. Estudo da sensibilidade a Antibióticos dos isolados bacterianos após inoculação artificial de tomates cereja antes e após irradiação por feixe de electrões.....	11
5. Resultados e Discussão .....	12
5.1. Estudos de inactivação por feixe de electrões da microbiota natural .....	12
5.2. Estudos de inactivação por feixe de electrões de microrganismos potencialmente patogénicos .....	15
5.3. Estudo da sensibilidade a Antibióticos dos isolados bacterianos resultante da inoculação artificial de tomates cereja.....	20
6. Conclusão .....	22
7. Bibliografia.....	23

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Esquema ilustrativo de uma curva de sobrevivência exponencial microbiana. ....	3
Figura 1.2: Representação esquemática do valor de D10.....	4
Figura 1.3: Símbolo internacional de irradiação de alimentos – Radura - que foi aprovado para a rotulagem de qualquer alimento irradiado a ser comercializado. (Codex Alimentarius, 2017) .....	5
Figura 5.4: Sobrevivência da população bacteriana mesófila de tomates cereja tratados por feixe de electrões, logo após tratamento (0 dias) e após 14 dias de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ; $\alpha = 0,05$ ). ....	12
Figura 5.5: Sobrevivência da população fúngica de tomates cereja tratados por feixe de electrões, logo após tratamento (0 dias) e após 14 dias de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ; $\alpha = 0,05$ ). ....	14
Figura 5.6: Sobrevivência da população de coliformes de tomates cereja tratados por feixe de electrões, logo após tratamento (0 dias) e após 14 dias de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ; $\alpha = 0,05$ ). ....	15
Figura 5.7: Curva de sobrevivência por feixe de electrões de <i>Escherichia coli</i> em tomates cereja, logo após tratamento (T0) e após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ; $\alpha = 0,05$ ). ....	16
Figura 5.8: Curva de sobrevivência por feixe de electrões de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium em tomates cereja, logo após tratamento (T0) e após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ; $\alpha = 0,05$ ). ....	17
Figura 5.9: Curva de sobrevivência por feixe de electrões da <i>Listeria monocytogenes</i> em tomates cereja, logo após tratamento (T0) e após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ; $\alpha = 0,05$ ). ....	19
Figura 5.10: Exemplo dos antibiogramas efectuados para as estirpes de <i>Escherichia coli</i> (A), <i>Salmonella</i> Typhimurium (B) e <i>Listeria monocytogenes</i> (C). ....	20

## Índice de Tabelas

Tabela 5.1: Valor de D10 da <i>Escherichia coli</i> para T0 e T14 antes e após armazenamento.....	16
Tabela 5.2: Valor de D10 de <i>Salmonella</i> Thiphimurium para T0 e T14 antes e após armazenamento	18
Tabela 5.3: Representação do D10 da <i>L. monocytogenes</i> para T0 e T14 dias de armazenamento .....	19
Tabela 5.4: Halos de inibição da <i>Escherichia coli</i> ((S) - Sensível; (R) - Resistente) (Halos medidos em mm) .....	20
Tabela 5.5: Halos de inibição de <i>Salmonella enterica</i> ((S) - Sensível; (R) - Resistente) (Halos medidos em mm) .....	21
Tabela 5.6: Halos de inibição para os isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> ((S) - Sensível; (R) - Resistente) (Halos medidos em mm).....	21

## Abreviaturas:

ADN - Ácido desoxirribonucleico

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FDA - *Food and Drug Administration*

IFE - Irradiação por Feixe de Electrões

LINAC – Acelerador Linear de electrões do inglês “LINear ACcelerator”

OMS - Organização Mundial de Saúde

## Unidades

J – Joule

MeV – Mega electrão Volt

kGy – Quilogray

Kg- Quilograma

g - Grama

mg – Miligrama

µg – Microgramas

° - Grau

°C - Graus Celsius

h – Horas

mim -Minutos

% - Percentagem

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

L – Litros

mL – Mililitros

log – Logaritmo decimal

m – Metros

ppm – Partes Por Milhão

# Resumo

**Palavras - Chaves:** Irradiação de alimentos, Feixe de electrões, Tomate cereja, Inativação microbiana e Segurança Alimentar

A irradiação de alimentos é definida como o processo no qual os alimentos são expostos à radiação ionizante, tais como raios gama (proveniente de fontes radioactivas de Co-60 ou Cs-137), feixes de electrões ou raios X. As aplicações da irradiação de alimentos são vastas, passando pela descontaminação e extensão do tempo de prateleira de frutas e vegetais que foi o tema da presente dissertação, até ao controlo do abrolhamento e senescência de legumes e frutas, ao tratamento fitossanitário, e esterilização de alimentos. A tecnologia de irradiação de alimentos visa a segurança alimentar, permite a redução de desperdício de alimentos, e promove a exportação dos alimentos tanto a nível nacional como internacional.

Este estudo foi realizado com tomates cereja e foi dividido em três etapas, na primeira avaliou-se a inativação da microbiota natural deste fruto por feixe de electrões, aplicando-se duas doses de radiação diferentes (1,4 kGy e 3,6 kGy) para estimar a sobrevivência de três tipos de população microbiana (bacteriana mesófila, fúngica e coliformes), logo após o tratamento e após 14 dias de armazenamento refrigerado. Os resultados indicaram uma redução de 4 log UFC/g para a carga microbiana das populações bacteriana mesófila e coliformes e a não detecção de fungos filamentos, após tratamento dos tomates cereja por feixe de electrões com uma dose de 3,6 kGy. Estes resultados mantiveram-se após 14 dias de armazenamento refrigerado.

A segunda etapa teve como objectivo estimar a inativação de microrganismos potencialmente patogénicos por feixe de electrões nos tomates cereja, recorrendo-se à contaminação artificial das amostras com as estirpes: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Os resultados apontaram uma cinética de inativação linear para as estirpes referidas, permitindo calcular a partir das curvas de sobrevivência os valores de D10 de 0,97 kGy, 0,84 kGy e 0,20 kGy para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Na última etapa do trabalho estudou-se o perfil de sensibilidade a antibióticos de estirpes de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*, antes e após o tratamento, de forma a estimar se o processo de irradiação de alimentos por feixe de electrões poderia induzir resistência a agentes antimicrobianos. Com base nos halos de inibição medidos, o perfil de susceptibilidade das estirpes bacterianas aos antibióticos Cloranfenicol (30 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Bacitracina (10 µg) e Rifampicina (5 µg) não foi alterado com o tratamento por feixe de electrões.

Concluindo, os resultados sugerem que a segurança alimentar dos tomates cereja pode ser assegurada por um tratamento por feixe de electrões com uma dose de 3 kGy com a potencial extensão do tempo de prateleira até 14 dias. Como trabalho futuro, pretende-se verificar o efeito desta tecnologia nas propriedades organolépticas e bioactivas deste fruto.



# Abstract

Key Words: Food irradiation, Electron beam, Cherry tomatoes, Microbial inactivation and Food Safety

Food irradiation is defined as the process in which foods are exposed to ionizing radiation, such as gamma rays from radioactive sources (Co-60 or Cs-137), electron beams or X-rays. The applications of food irradiation have become vast, including the decontamination and shelf-life extension of fresh food as the topic of the present dissertation, the control of germination and ripening of vegetables and fruits, phytosanitary treatment, and food sterilization. The food irradiation technology aims to guarantee food security, allows the reduction of food waste, and safe trade of food, nationally and internationally.

This study target was cherry tomatoes and the methodology was divided into three stages. In the first part, it was addressed the inactivation by e-beam of the natural microbiota of cherry tomatoes applying two irradiation doses (1.4 kGy and 3.6 kGy) to estimate the survival fraction of three microbial populations (mesophilic bacteria, filamentous fungi and coliforms) immediately after treatment and after 14 days of refrigerated storage. The obtained results indicated a reduction of 4 log CFU/g for the bioburden of the mesophilic bacteria and coliforms populations, fungi were not detected, after the treatment of cherry tomatoes with a dose of 3.6 kGy. These results were maintained after 14 days of refrigerated storage.

The second stage objective was to estimate the inactivation of potentially pathogenic microorganisms in cherry tomatoes by e-beam, using the artificial contamination of the fruit samples with the strains *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ATCC 14028 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. The results suggested that the tested strains follow a linear inactivation kinetics by e-beam on the cherry tomatoes, allowing to calculate through the survival curves the D10 values of 0.97 kGy, 0.84 kGy and 0.20 kGy for *E. coli*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes*, respectively.

The work, the antibiotic susceptibility profile of *E. coli*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* strains from before and after food irradiation treatment, was evaluated in order to estimate if the treatment by e-beam could induce resistance to antimicrobial agents. Based on the measured inhibition halos, the susceptibility profile of the bacterial isolates to Chloramphenicol (30 µg), Nalidixic Acid (30 µg), Ampicillin (10 µg), Bacitracin (10 µg) and Rifampicin (5 µg) did not altered.

In conclusion, the results suggested that the food safety of cherry tomatoes could be guaranteed by e-beam treatment using a dose of 3 kGy, with a potential shelf-life extension up to 14 days. As future work the effect of this technology on the organoleptic and bioactive properties of this fruit should be verified.

# **1. Introdução**

O conceito de irradiação de alimentos com o objectivo de melhorar a segurança alimentar e aumentar o tempo de prateleira dos alimentos tem mais de um século, contudo, só na década de 60 é que as infraestruturas de irradiação foram disponibilizadas comercialmente.

A irradiação de alimentos é definida como o processo no qual os alimentos são expostos à radiação ionizante, tais como raios gama proveniente de fontes radioactivas (Co-60 ou Cs-137), feixes de electrões ou raios X.

As aplicações da irradiação de alimentos tornaram-se vastas, passando desde a descontaminação; à esterilização para grupos de riscos como imunodeprimidos, astronautas, vítimas de calamidades e militares; ao controlo da germinação de plantas e controlo de amadurecimento de frutas e vegetais; até ao tratamento fitossanitário. Estas aplicações promovem a segurança alimentar, permitem a redução do desperdício de alimentos, e asseguram a exportação dos alimentos tanto a nível nacional como internacional (Roberts, 2014).

## **1.1. Irradiação por feixe de electrões**

A tecnologia de irradiação por feixe de electrões (IFE) é um processo de tratamento físico, isento de substâncias químicas, amigo do ambiente, não-térmico, que recorre a aceleradores de electrões, sendo uma alternativa de tratamento para alimentos que não podem ser processados termicamente (Adem, Angulo-Cervera, González-Jiménez, Valentín, & Marcos-Fernández, 2015) (Lung, *et al.*, 2015). Nesta tecnologia, são gerados electrões energéticos com capacidade de ionizar os átomos e as moléculas da matéria, produzindo radicais livres altamente reactivos que, reagem por sua vez com outras moléculas. Neste processo denominado por radiólise, os compostos resultantes são designados por produtos radiolíticos. Os efeitos induzidos podem ser quebras simples ou duplas na molécula de ADN dos organismos, sendo por isso a irradiação designada como agente letal (Silindir & Özer, 2009).

A interacção da radiação com a matéria não é mais do que transferência de energia. Introduce-se assim o conceito de dose absorvida, que é definida como a energia absorvida por unidade de massa ( $\text{J.kg}^{-1} = \text{Gy}$ ). Outro parâmetro é a taxa de dose, ou débito de dose ( $\dot{D}$ ), que se define como a dose absorvida por unidade de tempo, a qual se expressa em Gy/h (Silindir & Özer, 2009) (Martins, *et al.*, 2004).

No processamento de alimentos por irradiação, os equipamentos devem ser tecnologicamente simples, e os isótopos devem ter uma vida média adequada (*e.g.* Co-60 e Cs-137) para não ser necessária a sua reposição frequente, devendo igualmente emitir radiação ionizante suficientemente energética para penetrar nos produtos. Os efeitos dos raios gama, raios X e feixes de electrões são equitativamente efetivos para iguais quantidades de energia absorvida. A penetração efetiva dos feixes de electrões depende do nível de energia, mais especificamente, a profundidade de penetração de um acelerador de 10 MeV é aproximadamente 5 mm por MeV. Em termos de processo, a espessura máxima que um produto poderá ter será de 5 cm se irradiado só de um lado, ou 10 cm se for irradiado de ambos os lados. Apesar de menos penetrante comparativamente com a radiação gama, a irradiação por feixe de electrões pode ser ligada e desligada para reparação ou manutenção, requer geralmente menos tempo de exposição do produto devido ao débito de dose mais elevado, e não apresenta nenhum dos potenciais riscos associados aos materiais radioactivos após fogo, explosão ou outra catástrofe.

A irradiação é considerada uma alternativa para o processamento de alimentos termosensíveis, tais como as frutas e vegetais. Além disso, a utilização de tratamentos químicos, como o brometo de metilo e óxido de etileno, foi restringida a nível legislativo, dado o seu efeito nocivo para a saúde humana e ambiente. A irradiação de alimentos apresenta outras vantagens, nomeadamente a ausência de resíduos químicos aliados ao facto de os produtos poderem ser processados nas embalagens finais, o que reduz a possibilidade de contaminação cruzada até este ser realmente utilizado pelo consumidor. Esta tecnologia promove ainda uma economia de embalagens, transporte e armazenamento, permitindo o incremento da ecoeficiência em relação ao processamento convencional. Como em qualquer método de processamento de alimentos, o processo de irradiação deve seguir as boas práticas de fabrico, nomeadamente na manipulação, transporte e armazenamento dos alimentos, antes durante e após irradiação, devendo ser implementados sistemas efectivos de controlo que monitorizem os pontos críticos na instalação.

### **1.1.1 Mecanismos de inactivação microbiana por radiação ionizante**

Quando um produto é irradiado, a acção da radiação ionizante pode ser directa dos fotões – efeito directo, ou indirecta por reacção com os radicais livres produzidos – efeito indirecto.

A maioria das aplicações da irradiação de alimentos têm como objectivo a inactivação de certos microrganismos, nomeadamente os que causam a deterioração dos alimentos e/ou os potencialmente patogénicos. Os microrganismos são inactivados quando são expostos a factores que alteram substancialmente a sua estrutura celular ou as suas funções fisiológicas. Por inactivação entende-se que a célula deixa de ser viável, ou seja perde a capacidade de replicação. Os efeitos estruturais incluem danos na molécula de ADN ou na membrana celular. As alterações das funções celulares estão relacionadas com a inactivação de enzimas fundamentais ou com a modificação da selectividade da membrana celular (Silindir & Özer, 2009).

O alvo “crítico” da radiação ionizante é considerado a molécula de ADN, dado o seu papel crucial na célula. O efeito directo da radiação, ou seja a ionização directa da molécula de ADN, é o mecanismo de inactivação predominante quando microrganismos esporulados são irradiados. Alternativamente, a radiação pode interagir com outros átomos ou moléculas da célula, particularmente a água, produzindo radicais livres que se podem difundir de modo a atingir a molécula de ADN. Este efeito indirecto da radiação é importante nas células vegetativas dado o elevado conteúdo em água do citoplasma. As principais lesões induzidas pela radiação ionizante na molécula de ADN são consideradas as quebras na cadeia de ADN (simples ou duplas), formações de ligações cruzadas (base/base ou base/proteína), formação de centros abásicos e modificações das bases.

Os microrganismos têm uma resistência intrínseca à radiação ionizante que está relacionada com mecanismos enzimáticos de reparação dos danos causados e mecanismos de tolerância – fatores bióticos. A sensibilidade ou resistência de um microrganismo à radiação ionizante traduz-se assim na sua menor ou maior capacidade de resposta aos efeitos induzidos. No entanto, esta resposta pode ser alterada pelas condições extracelulares em que estão inseridos, como a temperatura, conteúdo em água, atmosfera e composição do substrato – fatores abióticos.

De uma forma generalizada, assume-se que a inactivação microbiana por um agente letal segue uma cinética exponencial. Especificando para a radiação ionizante, esta cinética caracteriza-se por um decréscimo exponencial do número de sobreviventes em função da dose absorvida, sendo

representada pela seguinte equação (Coggle, 1983): 
$$N = N_0 e^{-kD}$$

Em que:

N – número de sobreviventes (microrganismos viáveis) após exposição a uma dada dose de radiação.

$N_0$  – número de microrganismos viáveis antes da exposição à radiação.

k – constante característica dos microrganismos presentes que é dependente das circunstâncias ambientais em que estes estão expostos à radiação.

D – dose absorvida de radiação.

De acordo com a equação anterior, representando graficamente o logaritmo do número de sobreviventes (N) em função da dose absorvida (D) obtém-se uma curva de sobrevivência linear (ver Figura 1.1).

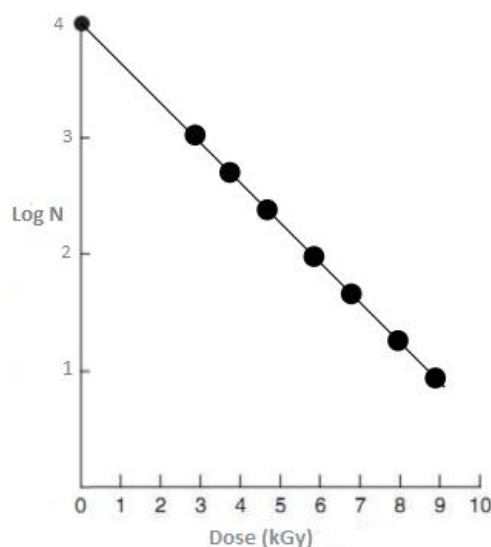


Figura 1.1: Esquema ilustrativo de uma curva de sobrevivência exponencial microbiana (Silverman, 1983).

A resposta específica dos microrganismos à radiação ionizante, também denominada por radioresistência, é avaliada através da determinação do parâmetro D10. O D10 é definido como a dose necessária para inactivar 90% de uma dada população microbiana, ou por outras palavras, a dose necessária para produzir uma redução decimal (1/10) na população microbiana inicial. O valor de D10 pode ser determinado a partir da equação da regressão linear da curva de inactivação exponencial apresentada anteriormente. Partindo da definição de D10, considera-se para esta dose uma sobrevivência de 10%, ou seja  $N = 0,1 N_0$ , pelo que substituindo obtém-se:

$$\log(0,1N_0) = -k'D_{10} + \log N_0 \Leftrightarrow \log(0,1N_0) - \log N_0 = -k'D_{10} \Leftrightarrow D_{10} = \frac{1}{k'}$$

O valor de D10 corresponde assim ao inverso do declive da recta de inactivação exponencial (Figura 1.2).

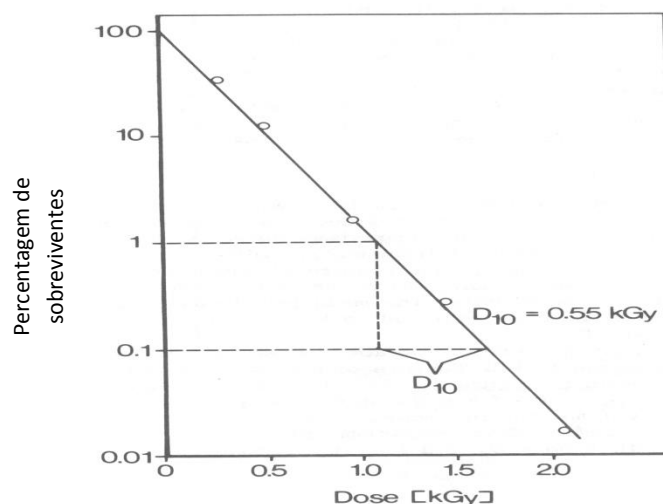


Figura 1.2: Representação esquemática do valor de D10 (Silverman, 1983) .

### 1.1.2 Legislação e comercialização na União Europeia

A irradiação de alimentos é um processo reconhecido por diversas organizações internacionais, incluindo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *Food and Drug Administration* (FDA). A OMS publicou em 1999 um relatório onde está citado que os alimentos resultantes do processo de irradiação para uma dose objectivada para o tratamento pretendido são seguros para o consumidor e nutricionalmente adequados (OMS, 1999). O primeiro esboço de Directiva Europeia sobre a irradiação de alimentos foi proposto pela Comissão Europeia em 1988. Esta continha uma “lista positiva” de nove produtos ou grupos de produtos para os quais a irradiação iria ser permitida. Após mais de 10 anos de debate no Parlamento Europeu surgiu uma nova Directiva que foi finalmente publicada a 13 de Março de 1999 (Directiva 99/2/EC). No decurso do processo legislativo, a “lista positiva” de nove grupos de produtos passou a um grupo: ervas aromáticas, especiarias e condimentos vegetais (Directiva 99/3/EC). A presente lista positiva é considerada provisória e vários estados membros possuem permissões nacionais para irradiar outros produtos como é o caso da Bélgica, França, Itália, Holanda e Reino Unido (EU, 2002; EU, 2003a). Adicionalmente, foi publicada uma lista de instalações aprovadas para irradiarem alimentos nos estados membros e países terceiros (EU, 2003b; EU, 2004a). No último relatório da Comissão Europeia sobre a irradiação de alimentos (EU, 2016), a quantidade aproximada de alimentos irradiados na União Europeia foi de 5685,9 toneladas em 2015, representando um crescimento de 9,7% na quantidade de alimentos processados por irradiação nos 28 Estados Membros comparativamente a 2014. Na Europa, a principal mercadoria irradiada são as pernas de rã (55%), seguida pelas ervas aromáticas secas, especiarias e condimentos vegetais (16%), sendo a Bélgica (70%) o país que mais recorre a este tipo de processamento alimentar. Portugal ainda não dispõe de um quadro legal específico sobre alimentos irradiados e transpõe a Directiva Europeia para a legislação nacional.

O processo de irradiação de alimento encontra-se regulamentado pela norma ISO 14470:2011, que é aplicada ao processamento, comercialização de alimentos e ingrediente alimentares, que devem ser rotulados com a seguinte frase “alimento tratado com radiação ionizante” apresentando igualmente o símbolo Radura (Figura 1.3).



**Figura 1.3: Símbolo internacional de irradiação de alimentos – Radura - que foi aprovado para a rotulagem de qualquer alimento irradiado a ser comercializado. (Codex Alimentarius, 2017)**

### **1.1.3 Aplicações da irradiação de alimentos**

A irradiação de alimentos a doses inferiores a 1 kGy foi recomendada para aplicações de desinfecção (ex. especiarias, cereais e frutos secos), para retardar a senescência e maturação de frutas e legumes, como é no caso das mangas, bananas, batatas, gengibre, cebolas e alhos. As doses de radiação entre 1 kGy e 10 kGy são consideradas adequadas para a redução da carga microbiana presente nos alimentos, prolongando assim, o seu tempo de vida útil, sendo um processo utilizado nas especiarias em pó, grãos de café, frutas/vegetais, frutos do mar e aves de capoeira (OMS, 1999). As doses de radiação superiores a 10 kGy podem ser utilizadas na desinfecção de alimentos para doentes imunodeprimidos ou outros grupos de risco e na esterilização de alimentos desidratados para os astronautas (Lung, *et al.*, 2015).

Atualmente, a investigação na área da irradiação de alimentos está a estudar a aplicabilidade de doses de radiação superiores a 3 kGy para aumentar a extractabilidade de compostos bioactivos dos alimentos (Lung, *et al.*, 2015).

A irradiação é cientificamente aceite como um eficiente método de preservação de alimentos e é aprovada em diversos países. No entanto, os altos custos iniciais de implementação da tecnologia e a sua associação a acidentes nucleares, têm limitado a globalização do processo comercial dos alimentos irradiados. Numerosos estudos documentaram a rejeição de alimentos irradiados por grande parte da população, que dificilmente avaliam seus benefícios ou estão mal informados. No entanto, essa rejeição tem vindo a diminuir ao longo dos anos (Schmidt, Palekar, Maxim, & Castillo, 2006).

### **1.2 Consumo de alimentos frescos**

Os vegetais e frutas são extremamente importante para a nutrição humana, sendo eles uma fonte de nutrientes, vitaminas, minerais e compostos bioactivos. Durante as ultimas décadas, diversos estudos demonstraram a relação entre estes alimentos e a saúde humana, ou seja, evidenciando um efeito protetor contra o cancro, problemas respiratórios ou do trato digestivo. Atualmente, também já foi comprovado que também têm um papel protector contra doenças cardiovasculares (Agudo, *et al.*, 2002).

De acordo com os dados da FAO, o aumento do consumo de vegetais na Europa aumentou nas últimas quatro décadas. No norte da Europa, o abastecimento de vegetais é mais baixo do que no sul da Europa, como por exemplo, na Finlândia, o valor médio é de 195 g por pessoa por dia, o que

corresponde a 71 kg por pessoa por ano, enquanto na Grécia possui o seu valor médio de 756 g por pessoa por dia (276 kg por pessoa por ano) (Eufic, 2012).

No entanto, os alimentos frescos consumidos crus, são reconhecidos como importantes veículos de transmissão de agentes patogénicos. Além disso, durante o crescimento, a colheita, e posterior processamento, estes produtos podem ser contaminados com agentes patogénicos provenientes de fontes humanas ou animais. Um amplo espectro de microrganismos potencialmente patogénicos e vias de transmissão tem sido documentado em surtos de toxinfecções associados ao consumo de alimentos frescos. Por exemplo, os produtos alimentares podem ser contaminados por microrganismos potencialmente patogénicos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*, que estão naturalmente presentes no solo. Os fertilizantes naturais (estrume), as águas de rega ou lavagem são outros veículos de contaminação microbiana de alimentos, nomeadamente por *Salmonella*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Vibrio cholerae*, parasitas e vírus (Castell-Perez, Moreno, Rodriguez, & Moreira, 2004). Na União Europeia em 2013, foram contabilizados cerca de 5196 surtos de origem alimentar (incluindo os transmitidos através de água) e desses 11 foram relatos como óbitos. A maioria dos surtos notificados de origem alimentar foi causado por *Salmonella* (22,5% de todos os surtos), seguido por vírus (18,1%), toxinas bacterianas (16,1%) e *Campylobacter* (8,0%) (Authority & Control, 2015).

Os alimentos frescos, principalmente as frutas, são muito sensíveis a condições inadequadas de processamento, armazenamentos e transporte, sendo fundamental existir processamentos pré-colheita e pós-colheita adequados para preservar a qualidade do produto e para o sucesso da comercialização (Rees, Farrell, & Orchard, 2012). A preservação de alimentos tem sido assegurada recorrendo a substâncias químicas, novas embalagens, atmosferas modificadas, refrigeração, entre outras tecnologias ou processos para atrasar a maturação, reduzir a contaminação microbiológica, ou ainda suportar condições de refrigeração. Estas práticas são pouco eficientes, têm um impacto ambiental nocivo e deixam resíduos no produto, com claro prejuízo para a qualidade alimentar e saúde pública, considerando os ainda numerosos incidentes reportados, tais como a presença de microrganismos patogénicos, o excesso de conservantes (sulfitos), a presença de insectos e de micotoxinas. Desta forma, é necessário colocar ao dispor do sector agroalimentar uma ferramenta alternativa de processamento pós-colheita.

### **1.3 Tomate**

Em relação ao tomate, uma vez que é o tema de estudo, é classificado mundialmente como o 4º fruto mais importante. A FAO reportou que a produção mundial de tomates em 2009 foi de 152956115 toneladas, sendo a China, os Estados Unidos, Índia, Turquia, Egipto e Itália os principais produtores (Rees, Farrell, & Orchard, 2012).

Em Portugal, entre as indústrias alimentares, a do tomate é considerado um das mais importantes, tanto para a agricultura como para a economia portuguesa. Em 2012, Portugal, exportou cerca de 95% da produção nacional. A produção de tomates é realizada em dois ciclos distintos, Primavera/Verão e Outono/Inverno, centralizando-se, principalmente, no Ribatejo, onde em 2000 foi produzido cerca de 750664 toneladas e em 2010 cerca de 281841; e no Alentejo, onde em 2000 registou-se um valor de 137436 toneladas que aumentou em 2010 para 1100493 toneladas (Raquel & Teixeira, 2013).

Os tomates são considerados alimentos saudáveis por várias razões, têm baixos níveis de gorduras e calorias, não contêm colesterol e são uma boa fonte de fibras. São ricos em vitaminas A e C,  $\beta$ -caroteno, licopeno entre outros antioxidantes (Soto-Zamora, Yahia, Brecht, & Gardea, 2005). É uma fruta que se caracteriza por um pH baixo, que pode variar entre os 3.4 e os 4.8, dependendo do

seu estado de maturação (Schmidt, Palekar, Maxim, & Castillo, 2006). A cor é um dos componentes de qualidade mais importantes das culturas hortícolas, e no caso do tomate podemos encontrá-lo em diferentes cores, como vermelho, rosa, amarelo e laranja (Rees, Farrell, & Orchard, 2012).

O tamanho do fruto é outra característica muito importante, que varia conforme as preferências dos cultivadores, consumidores, e de acordo com o uso pretendido para o fruto, podendo este ser esférico, alongados ou em forma de pêra (Rees, Farrell, & Orchard, 2012).

Quanto à sua firmeza esta poderá estar relacionada com a qualidade do fruto e do seu amadurecimento, sendo uma característica importante para a sua capacidade de transporte e de vida pós-colheita. Em termos genéricos, os consumidores preferem este fruto firme, sem pele dura e que não perca muito sumo ao cortá-lo (Rees, Farrell, & Orchard, 2012).

Em relação ao seu sabor podemos ter a percepção de muitos dos seus constituintes, tais como os açúcares (*e.g.* frutose, a glicose, e a sacarose), os ácidos (ácidos cítrico e málico), sendo nesta interacção entre o doce e o ácido, que se forma o seu sabor característico.

O processamento do tomate pós-colheita é efectuado por lavagem com soluções desinfetantes à base de cloro. Contudo, foi reportado que se a temperatura da água de lavagem for inferior à dos tomates, pode ocorrer a internalização de microrganismos, nomeadamente através da cicatriz do caule, uma vez que é um ponto de acumulação (Schmidt, Palekar, Maxim, & Castillo, 2006).

Contudo, estes frutos podem ser veículos de microrganismos patogénicos, causando toxinfecções alimentares, podendo também potenciar a propagação de infecções aquando o seu transporte para outras regiões (Guerreiro, *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os tomates frescos atraíram muita atenção pelas suas características nutricionais, mas também por terem estado associados a mais de mil surtos de toxinfecção alimentar registados em todo o mundo (Guerreiro, *et al.*, 2016).

### **1.3.1 Tomate Cereja**

O tomate cereja (*Solanum lycopersicus* var. *Cerasiforme*) é uma variedade de tomate fresco de tamanho pequeno, com sabor a tomate e textura firme, rico em antioxidantes, como os carotenóides, ácido ascórbico e compostos fenólicos, sendo uma fonte predominante de licopeno (um carotenóide que fornece a cor avermelhada aos tomates). A presença destes compostos bioactivos promove efeitos benéficos para a saúde, como na prevenção de vários tipos de cancro no tracto digestivo. (Guerreiro, *et al.*, 2016).

O tempo de prateleira desta fruta varia de cinco a sete dias, dependendo do momento da colheita, o que pode ser uma limitação para a sua ampla comercialização e exportação (Martins, *et al.*, 2004).



## **2. Problemática**

A segurança alimentar é um dos desafios actuais, dada a necessidade de alimentar uma população crescente e assegurar as exigências do consumidor por produtos frescos e variados. No entanto, existe igualmente a necessidade de abordar questões relacionadas com o fornecimento de alimentos seguros e saudáveis. Nomeadamente, com o aumento do consumo de produtos frescos, tem-se verificado uma maior incidência de doenças infecciosas transmitidas por alimentos, nomeadamente por microrganismos como a *Salmonella*, *Shigella*, e *Escherichia coli* 0157:H7 (Schmidt, Palekar, Maxim, & Castillo, 2006). O tomate é um alimento reconhecido em todo o mundo dado a sua contribuição para com a saúde humana, sendo o tomate cereja bastante popular. Esta fruta tem um tempo de prateleira de 5 a 7 dias, dependendo do momento da colheita, o que pode ser limitante para a sua comercialização mais alargada (Guerreiro, *et al.*, 2016).

É assim necessário desenvolver um processo de tratamento seguro e eficaz que garanta a segurança microbiológica e a preservação de alimentos por períodos de tempo mais alargados, sem ser necessário recorrer-se à utilização de conservantes.

A irradiação de alimentos é um processo físico que consiste na exposição dos alimentos a uma quantidade de radiação ionizante específica e controlada. Este processo de tratamento é correntemente utilizado no tratamento de mais de 60 géneros alimentícios em cerca de 50 países.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a tecnologia de irradiação por feixe de electrões, como um tratamento pós-colheita para garantir a segurança e qualidade de tomate cereja, para o qual a tecnologia de irradiação ainda não tinha sido validada. A abordagem metodológica envolveu análises microbiológicas de forma a verificar a aplicabilidade da irradiação com feixe de electrões como método de descontaminação microbiana, tanto para eliminação de microrganismos potencialmente patogénicos como os deteriorantes, para extensão do tempo de prateleira.

### **3. Objectivos**

O principal objectivo deste estudo foi a validação da utilização de feixe de electrões como tratamento pós-colheita de tomate cereja, de forma a assegurar a segurança e qualidade desta fruta com uma potencial extensão do tempo de prateleira.

Os objectivos específicos do estudo foram:

- 1) Determinação da cinética de inactivação por feixe de electrões da população bacteriana e fúngica presente nos tomates cereja e de microrganismos potencialmente patogénicos inoculados artificialmente (*e.g. Escherichia coli*, *Salmonella* Thyphimurium; *Listeria monocytogenes*) antes e após armazenamento refrigerado (14 dias).
- 2) Estudo da sensibilidade e resistência a antibióticos de largo espectro de estirpes bacterianas de tomates cereja não irradiados e irradiados. Pretendia-se abordar a aquisição de resistência a antibióticos por parte de bactérias potencialmente patogénicas, pelo mecanismo de acção da radiação ionizante de indução de mutações, questão que tem sido recentemente imputada à irradiação de alimentos.
- 3) Comparação dos resultados com os obtidos anteriormente com o tratamento por radiação gama.

## **4. Metodologia**

### **4.1. Irradiação das amostras**

Os tomates cereja (*Solanum lycopersicus* var. *Cerasiforme*) foram adquiridos num mercado em Lisboa e mantidos a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  até sua análise (máximo 18 h).

Nos estudos de inactivação da microbiota natural, as amostras com 150 g de tomates cereja foram colocadas em sacos de stomacher estéreis, e irradiadas no acelerador de electrões (LINAC GE Saturne 41) localizado no Campus Tecnológico e Nuclear, às doses de 1,4 kGy e 3,6 kGy, a um débito de dose médio de 42 kGy/h. Na análise da inactivação de microrganismos inoculados artificialmente, as amostras com 25 g de tomates cereja foram colocadas em sacos de stomacher, e irradiadas no LINAC a três doses de radiação entre 0,5 kGy e 1,5 kGy, a um débito de dose médio de 30 kGy/h.

As doses absorvidas foram monitorizadas com dosímetros radiocrómicos de rotina FWT-60 (Far West Technology Inc.), previamente calibrados por uma câmara de ionização de referência PPC40 (CNMC TeamBest).

Para cada dose absorvida foram irradiadas três amostras, e como controlo foram utilizadas amostras de tomate cereja não irradiadas (0 kGy), também em triplicado.

### **4.2. Estudos de inactivação por feixe de electrões da microbiota natural**

Após irradiação, as amostras irradiadas e não irradiadas (controlo), foram subdivididas assepticamente em amostras de 25 g (das 150 g inicialmente pesadas), para um saco de stomacher de forma a obter para cada uma das réplicas de cada dose de irradiação e controlo duas subamostras: Tempo 0 (T0) – analisadas logo após irradiação; e Tempo 14 (T14) – analisadas 14 dias após irradiação e mantidas refrigeradas (3 amostras 0 kGy, 3 amostras 1,4 kGy, 3 amostras 3,6 kGy e 3 amostras 7,4 kGy x 2 tempos). Às amostras identificadas como tempo 0 foi adicionado 100 ml de uma solução de lavagem composta por soro fisiológico (0,9% NaCl) com 0,1% de Tween 80, e homogeneizadas no stomacher durante 15 min. As restantes amostras foram armazenadas a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

A quantificação da carga microbiana das amostras de tomates cereja foi efectuada por inoculação de alíquotas de diluições decimais seriadas das soluções de lavagem das amostras (duas diluições e três réplicas por diluição/amostra) em três meios de cultura diferentes: *Tryptic Soy Agar* (TSA) para analisar a população bacteriana mesófila; *Malt Extract Agar* (MEA) para analisar a população fúngica, e *Violet Red Bile Agar* (VRBA) para a detecção e enumeração de coliformes. As placas inoculadas de TSA foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$ , as de MEA a  $28^\circ\text{C}$ , e as VRBA a  $35^\circ\text{C}$ . A contagem das colónias foi realizada às 24, 48, 72 h, ao 5º e ao 7º dia de incubação, e os resultados expressos em logaritmo decimais de Unidades Formadoras de Colónias por grama de tomate cereja fresco (UFC/g).

As amostras armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  correspondentes ao T14 dias após irradiação foram analisadas segundo o procedimento acima descrito.

#### **4.3. Estudos de inativação por feixe de electrões de microrganismos potencialmente patogénicos**

Os estudos de inativação por feixe de electrões de microrganismos potencialmente patogénicos foram realizados utilizando três estirpes bacterianas diferentes, inoculadas individualmente em amostras de tomates cereja, previamente desinfetados com uma solução de etanol a 70% (e deixados secar numa câmara de fluxo laminar) para eliminar a microbiota natural. As estirpes utilizadas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 8739, e *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, foram isoladas e mantidas no meio de cultura TSA.

As suspensões de cada microrganismo foram preparadas numa solução fisiológica (0,9% NaCl) com uma concentração de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL, estimada recorrendo a uma Câmara de Neubauer. A partir de cada uma das suspensões bacterianas preparadas foram inoculadas superficialmente quatro amostras de 150 g de tomates cereja desinfetados (cada tomate foi inoculado com 10 µL da suspensão), que após secagem do inóculo na câmara de fluxo laminar foram irradiados no feixe de electrões a três doses entre 0,5 e 1,5 kGy (0 kGy amostra controlo).

Após irradiação, cada uma das amostras irradiadas e controlo, foi subdividida em subamostras de 25 g (3 réplicas para cada dose x 2 tempos) para sacos de stomacher estéreis. Um conjunto de subamostras correspondente ao Tempo 0 (logo após irradiação) foi imediatamente analisado, e as restantes subamostras foram armazenadas a 4°C durante 14 dias (Tempo 14).

A cada amostra foi adicionado 100 ml de soro fisiológico com 0,1% de Tween 80 e homogeneizada durante 15 min no stomacher. A carga microbiana foi estimada por inoculação de alíquotas de diluições decimais seriadas das soluções de lavagem das amostras (duas diluições e três réplicas por diluição/amostra) em meio de cultura TSA. A contagem do número de colónias foi realizada às 24, 48 e 72 h, 5º e 7º dia de incubação a 37°C. O mesmo procedimento foi realizado 14 dias após irradiação para as amostras armazenadas a 4°C.

Os resultados expressos em logaritmo decimal de Unidades Formadoras de Colónias por grama de tomate cereja fresco (UFC/g).

#### **4.4. Estudo da sensibilidade a Antibióticos dos isolados bacterianos após inoculação artificial de tomates cereja antes e após irradiação por feixe de electrões**

Da população sobrevivente após irradiação e controlos (0 kGy) da inoculação artificial de tomates cereja foram selecionados aleatoriamente para cada dose de radiação e tempo de armazenamento, 3 colónias de: *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, que foram posteriormente isoladas em TSA. Como referência utilizou-se culturas puras das estirpes de origem de cada uma das bactérias referidas anteriormente. A partir das culturas puras dos isolados foram preparadas suspensões bacterianas em soro fisiológico (turbidez 0.5 escala Macfarland) que foram inoculadas por espalhamento direto na superfície do meio de cultura TSA. Foram preparados discos de difusão com 30 µg de Cloranfenicol, 30 µg Ácido Nalidíxico, 10 µg de Ampicilina, 10 µg Bacitracina e 5 µg de Rifampicina; que foram colocados nas placas após secagem do inóculo. Os antibiogramas foram colocados a incubar a 37°C e a leitura dos halos de inibição foi efetuada com um paquímetro às 24 e 48 h de incubação.

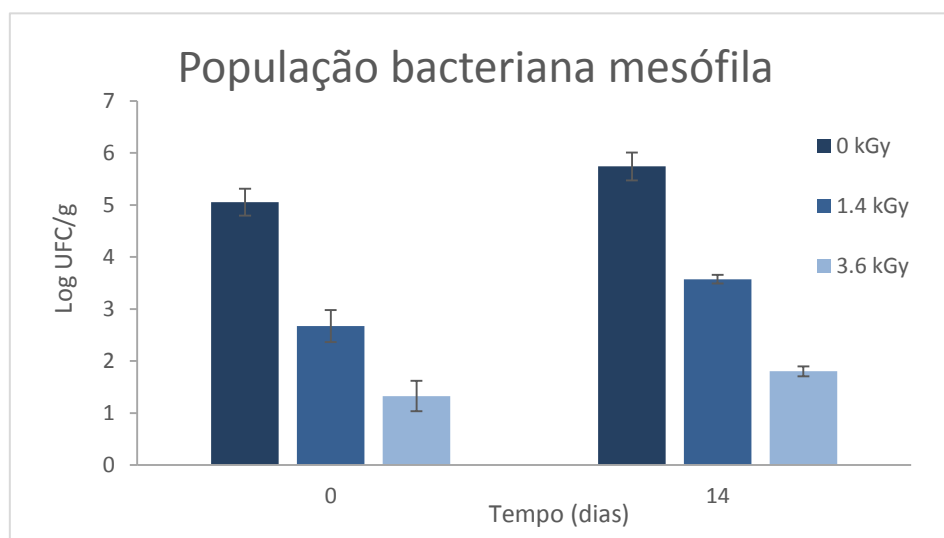
## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Estudos de inativação por feixe de electrões da microbiota natural

Com o objectivo de avaliar a descontaminação microbiana e a potencial extensão do tempo de prateleira de tomates cereja tratados por feixe de electrões, foi estudada a cinética de inativação microbiana, por esta tecnologia, de três tipos de população microbiana (bacteriana mesófila, fúngica, coliformes) logo após o tratamento e após 14 dias de armazenamento refrigerado.

#### 5.1.1. População bacteriana mesófila

O valor médio da carga bacteriana mesófila inicial estimada para as amostras de tomate cereja foi de  $5,1 \pm 0,1$  log UFC/g. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a população microbiana mesófila do tomate cereja segue uma cinética de inativação linear imediatamente após a irradiação (T0) e após armazenamento durante 14 dias (T14). O decréscimo máximo obtido para a carga bacteriana mesófila logo após tratamento por feixe de electrões (3,6 kGy) foi de 4 log UFC/g. Após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14), o valor médio da carga bacteriana mesófila das amostras não tratadas aumentou ligeiramente para  $5,7 \pm 0,1$  log UFC/g, contudo manteve-se o decréscimo de 4 log UFC/g desta população microbiana nos tomates cereja irradiados por feixe de electrões a 3,6 kGy. (Figura 5.1)



**Figura 5.4:** Sobrevivência da população bacteriana mesófila de tomates cereja tratados por feixe de electrões, logo após tratamento (0 dias) e após 14 dias de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

Comparativamente com os resultados obtidos anteriormente para o tratamento dos tomates cereja por radiação gama, verificou-se igualmente uma cinética de inativação linear para a população bacteriana mesófila, mas o decréscimo máximo da carga bacteriana mesófila foi de apenas 2 log UFC/g nos tomates cereja irradiados a 5,7 kGy (Guerreiro, *et al.*, 2016). Estes resultados sugerem uma maior eficiência do tratamento de descontaminação por feixe de electrões. Esta diferença entre as duas tecnologias de irradiação, poderá dever-se ao superior débito de dose do tratamento por feixe de electrões (42 kGy/h) comparativamente com o por radiação gama (1,8 kGy/h), dada a incapacidade

dos sistemas de reparação de responder rapidamente aos danos induzidos constantemente no maior débito de dose (Cabo Verde, 2018).

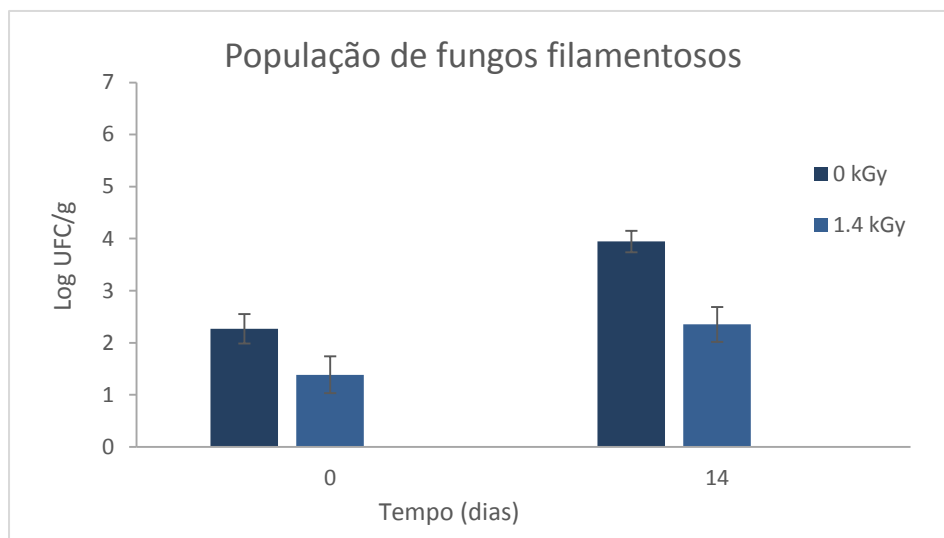
Relativamente a outras tecnologias não-térmicas de processamento de alimentos, a literatura documenta a aplicação do tratamento por UV em tomates, demonstrando que para uma carga microbiana mesófila de 2 log UFC/g é obtida uma redução da população mesófila de 0,6 log para uma energia 4,16kJ/m<sup>2</sup> e de 1,2 log para a energia de 2,56 kJ/m<sup>2</sup> (Pinheiro, Alegria, Abreu, Gonçalves, & Silva, 2015). Outros estudos indicam que o tratamento de tomates cereja por ultrassom reduz a carga microbiana total inicial em 1 log UFC/g, e que a combinação deste tratamento com soluções químicas aumenta a redução da carga microbiana para 2 log UFC/g combinado com 5% de peróxido de hidrogénio e para 3 log UFC/g com 40mg/L de ácido peracético (Bilek & Turantaş, 2013).

Os resultados obtidos para a descontaminação da população bacteriana mesófila de tomates cereja por feixe de electrões sugeriram uma maior eficiência deste tratamento (99,99%) comparativamente com outros processos não-térmicos reportados na literatura (<99.9%), com a vantagem de não recorrer a adjuvantes químicos, um potencial benefício para o ambiente e a saúde pública. Adicionalmente, os resultados apontaram igualmente para a possível extensão do tempo de prateleira deste fruto até 14 dias quando processado por feixe de electrões.

### **5.1.2. População fúngica filamentosa**

Em relação à população fúngica, verificou-se que o valor médio da carga fúngica inicial dos tomates cereja foi  $2,3 \pm 0,1$  log UFC/g, observando-se com o aumento da dose de radiação uma diminuição do número de fungos filamentosos até não serem detectados à dose máxima aplicada de 3,6 kGy.

Após 14 dias de armazenamento refrigerado, a população fúngica aumentou o seu número (aproximadamente 2 log UFC/g para  $3,9 \pm 0,1$  log UFC/g) nas amostras não tratadas por feixe de electrões. No entanto, nas amostras processadas por feixe de electrões à dose de 3,6 kGy continuaram a não ser detectados fungos filamentosos (Figura 5.2). Este resultado vem suportar a potencial extensão do tempo de prateleira até 14 dias dos tomates cereja irradiados por feixe de electrões, considerando o papel dos fungos filamentosos na deterioração dos alimentos frescos (Wang, *et al.*, 2008).



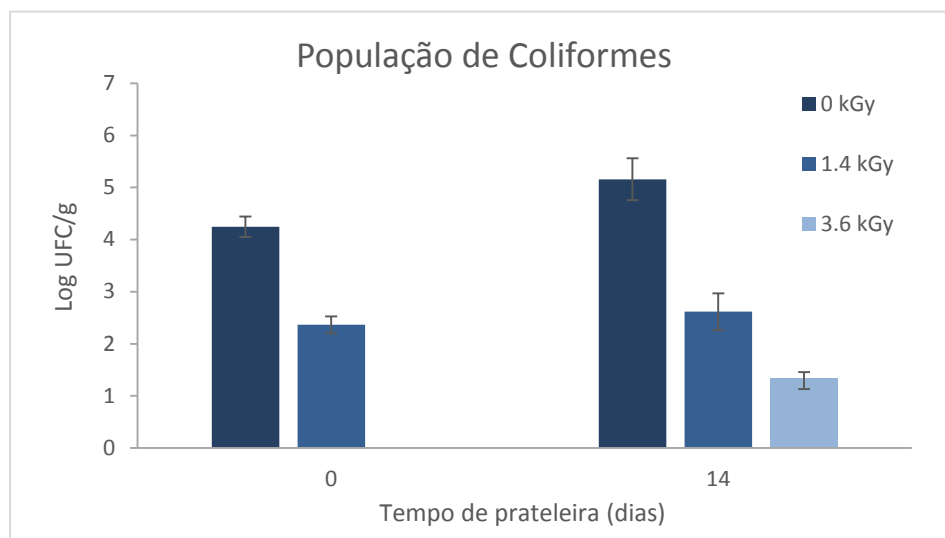
**Figura 5.5: Sobrevivência da população fúngica de tomates cereja tratados por feixe de electrões, logo após tratamento (0 dias) e após 14 dias de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ;  $\alpha = 0,05$ ).**

De uma forma geral, os fungos são mais resistentes ao tratamento por radiação ionizante do que as bactérias (Aquino, 2001). Numa revisão da literatura acerca da inactivação de fungos por radiação gama em alimentos, encontra-se descrito o efeito da radiação gama na população fúngica de diversos substratos alimentares, referindo que para a gama de doses entre 2 e 5 kGy é geralmente verificado uma diminuição da carga fúngica e para 10 kGy a ausência desta população microbiana para todos os substratos alimentares analisados (Aquino, 2001). A dose mencionada de radiação gama para a eliminação dos fungos dos alimentos é superior à aplicada no presente estudo por feixe de electrões, enfatizando mais uma vez a maior eficiência desta última tecnologia dado o seu elevado débito de dose.

No mesmo estudo mencionado anteriormente de Bilek & Turantaş, 2013, o efeito do tratamento por ultrasons foi igualmente avaliado na inactivação da população fúngica dos tomates cereja, tendo os autores obtido decréscimos de 0,7 log UFC/g na carga fúngica para o tratamento isolado e de 3,3 log UFC/g para o tratamento combinado com 40mg/L de ácido peracético (Bilek & Turantaş, 2013).

### 5.1.3. População de Coliformes totais

O número de coliformes totais presentes nos alimentos é geralmente considerado um indicador de higiene e contaminação após o processamento pois a sua presença pode estar relacionada com contaminação de origem fecal. A concentração inicial média de coliformes totais nas amostras de tomates cereja foi de  $4,2 \pm 0,1$  log UFC/g, que foi diminuindo logo após irradiação (T0) com o aumento da dose de radiação por feixe de electrões até não serem detectados microrganismos desta população à dose de 3,6 kGy. À semelhança das outras populações microbianas estudadas, o valor de coliformes totais aumentou 1 log UFC/g nos tomates cereja não tratados e refrigerados durante 14 dias. Porém, após armazenamento foi detectada a presença de coliformes totais em todas as amostras (não tratadas e irradiadas), embora tenha sido verificado uma redução de 4 log UFC/g na população de coliformes dos tomates cereja irradiados a 3,6 kGy comparativamente com a amostra controlo (0 kGy T14) (Figura 5.3). Este resultado sugere que alguns microrganismos sobreviventes da população de coliformes foram capazes de reparar as lesões causadas pela irradiação durante o período de armazenamento refrigerado.



**Figura 5.6:** Sobrevivência da população de coliformes de tomates cereja tratados por feixe de electrões, logo após tratamento (0 dias) e após 14 dias de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

Outros estudos documentaram a inactivação de coliformes totais em vegetais frescos por outros processos de tratamento não térmicos, nomeadamente foi verificado um decréscimo de 1 log UFC/g da população de coliformes em cenouras tratadas com ozono (80 mg/min) e em alface lavada com uma solução de cloro a 100 ppm durante 20 min (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2013). Embora, os alimentos sejam diferentes, o processamento por feixe de electrões indica ser mais eficiente na descontaminação de coliformes totais em alimentos, tendo como potencialidade o aumento do tempo de prateleira dos alimentos.

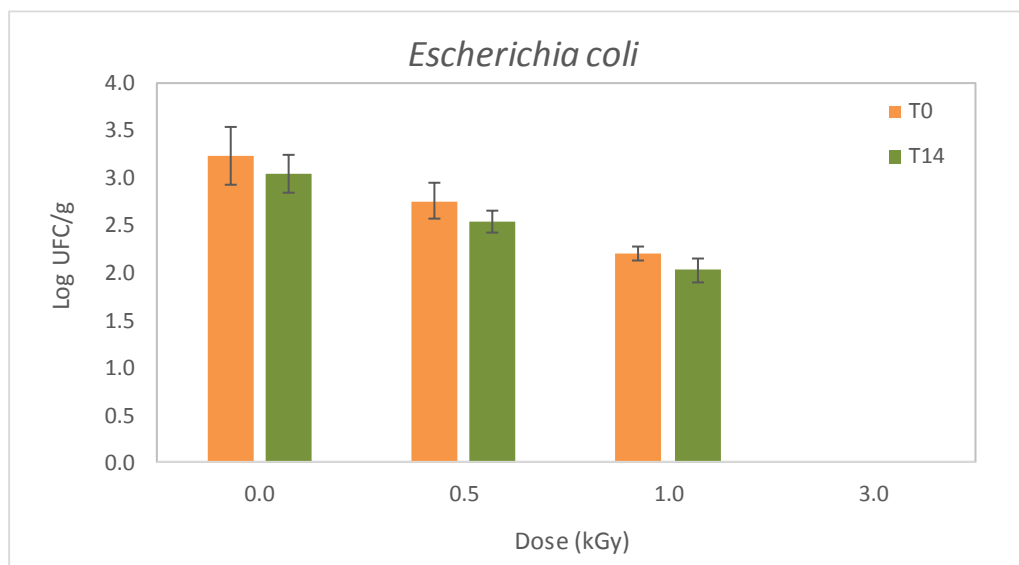
## **5.2. Estudos de inactivação por feixe de electrões de microrganismos potencialmente patogénicos**

Nesta etapa do trabalho pretendia-se avaliar a eficácia do tratamento do feixe de electrões na desinfecção dos tomates cereja. Para este estudo, recorreu-se à contaminação artificial com estirpes bacterianas potencialmente patogénicas e comumente associadas a toxinfecções alimentares, tais como *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Para cada uma das referidas estirpes avaliou-se individualmente a sua cinética de inactivação nos tomates cereja por feixe de electrões, antes e após armazenamento, e estimou-se o valor de D10.

### ***5.2.1. Escherichia coli***

A bactéria *E. coli* tem sido frequentemente associada a surtos alimentares, devido a contaminação fecal das águas ou solos, e ao facto de poder permanecer viável até 70 dias. A contaminação dos alimentos pode também ocorrer pós-colheita por intermédio da água de lavagem (Neal, Cabrera-Diaz, Lez, Maxim, & Castillo, 2008).





**Figura 5.7:** Curva de sobrevivência por feixe de electrões de *Escherichia coli* em tomates cereja, logo após tratamento (T0) e após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

A bactéria *E. coli* indicou uma cinética de inactivação linear nos tomates cereja por feixe de electrões, não sendo detectada nos frutos irradiados a 3 kGy (Figura 5.4). Esta tendência foi igualmente verificada após 14 dias de armazenamento refrigerado.

Outros estudos referem a eficiência de métodos de desinfecção em tomates cerejas indicando uma redução da população de *E. coli* de 2,3 log UFC/g pelo tratamento dióxido de cloro aquoso e de 2,6 log UFC/g pelo tratamento UV-C (Song, Choi, & Song, 2011).

Comparativamente com o tratamento por radiação gama, a eficiência de inactivação de *E. coli* nos tomates cereja foi similar (ausência de detecção deste microrganismo) para a mesma dose radiação 3 kGy (Guerreiro, *et al.*, 2016).

Com base nos resultados obtidos estimou-se o valor de D10 para *E.coli* nos tomates cereja, antes (T0) e após (T14) armazenamento (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1:** Valor de D10 de *Escherichia coli* para T0 e T14 antes e após armazenamento

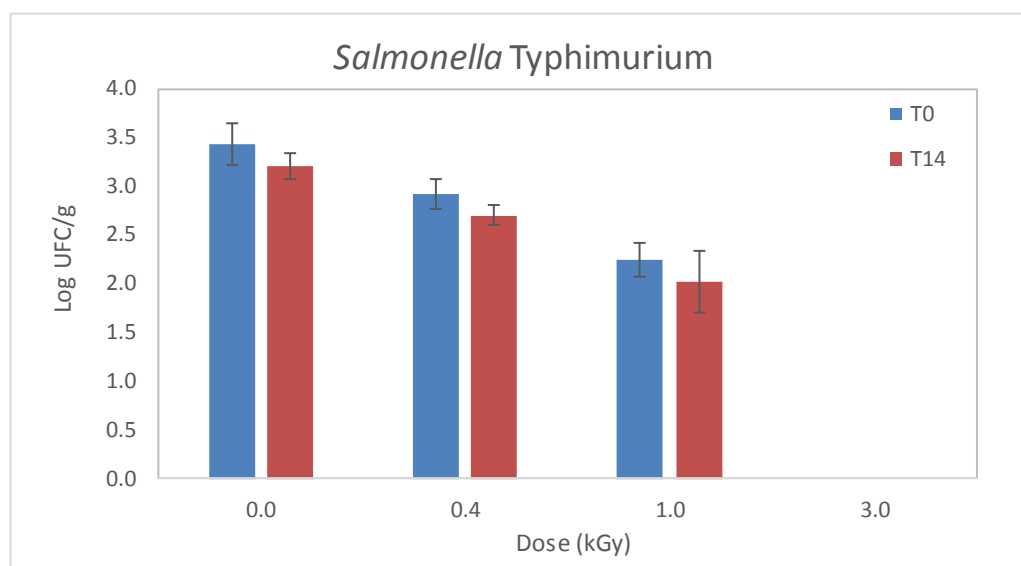
Tempo	Regressão linear da curva de sobrevivência	R <sup>2</sup>	D10 ± Erro padrão
<b>T0</b>	Log N = -1,03 D + 3,24	0,999	0,97 ± 0,01 kGy
<b>T14</b>	Log N = -1,02 D + 3,04	0,999	0,98 ± 0,01 kGy

De acordo com a literatura, o valor do D10 de *E. coli* varia entre 0,241 a 0,307 kGy (Neal, Cabrera-Diaz, Lez, Maxim, & Castillo, 2008). Como se pode verificar pela Tabela 1, os valores obtidos de D10 foram superiores aos documentados, e semelhantes para ambos os tempos de armazenamento. Esta elevada radioresistência da bactéria *E. coli* nos tomates cereja já tinha sido anteriormente verificada para o tratamento por radiação gama (Guerreiro, *et al.*, 2016), podendo dever-se a factores de radioprotecção por parte de algum dos constituintes do tomate cereja.

### 5.2.2. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium

O tomate é um fruto com um pH baixo, entre 3,4 e 4,8, dependendo da variedade e do seu estado de maturação, e é frequentemente assumido que muitos agentes patogénicos associados ao produto não consigam sobreviver neste produto (Schmidt, Palekar, Maxim, & Castillo, 2006). Os microrganismos do género *Salmonella* podem adaptar-se a condições reduzidas de pH e tolerar condições ambientais de stress (Schmidt, Palekar, Maxim, & Castillo, 2006). Os casos de doenças transmitidas por tomates e subprodutos contaminados continuam a representar um problema significativo de segurança alimentar. Embora *Shigella* tenha sido implicada em surtos alimentares associados ao tomate, *Salmonella* é o microrganismo mais reportado. Desde 1990, houve pelo menos nove grandes surtos de salmonelose devido ao consumo de tomate resultando em mais de 1600 hospitalizações e três mortes (Shi, Namvar, Kostrznska, Hora, & Warriner, 2007).

À semelhança de *E. coli*, a estirpe de *Salmonella* testada indicou uma cinética de inactivação linear nos tomates cereja por feixe de electrões, não sendo detectada nas amostras irradiados a 3 kGy, mantendo-se este resultado após 14 dias de armazenamento refrigerado (Figura 5.5).



**Figura 5.8:** Curva de sobrevivência por feixe de electrões de *Salmonella enterica* Typhimurium em tomates cereja, logo após tratamento (T0) e após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g ( $n = 18$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

Os resultados obtidos suportam a eficiência do tratamento pós-colheita de tomates cereja por feixe de electrões na inactivação de *Salmonella*, superando ou igualando o documentado na literatura para outros tratamentos alimentares não térmicos, nomeadamente o obtido anteriormente por radiação gama (Guerreiro, *et al.*, 2016). Entre outros exemplos, o tratamento de tomates indicou uma redução na população de *Salmonella* Thiphimurium de 1,2 log UFC/cm<sup>2</sup> após lavagem com dióxido de cloro aquoso (Pao, Kelsey, Khalid, & Ettinger, 2007), de 2,6 log UFC/g por UV (Mukhopadhyay, Ukuku, Juneja, & Fan, 2014) e de 3,9 log UFC/g por combinação de ultrassons com o ácido peracético (Brilhante São José & Dantas Vanetti, 2012).

A radioresistência de um microrganismo pode ser avaliada através do valor de D10. Os valores de D10 estimados para a estirpe de *Salmonella* Typhimurium nos tomates cereja, antes (T0) e após armazenamento (T14), encontram-se resumidos na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2: Valor de D10 de *Salmonella* Typhimurium para T0 e T14 antes e após armazenamento**

<b>Tempo</b>	<b>Regressão linear da curva de sobrevivência</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>D10 ± Erro padrão</b>
<b>T0</b>	Log N = -1,19 D + 3,43	0,999	0,84 ± 0,01 kGy
<b>T14</b>	Log N = -1,19 D + 3,20	0,999	0,84 ± 0,02 kGy

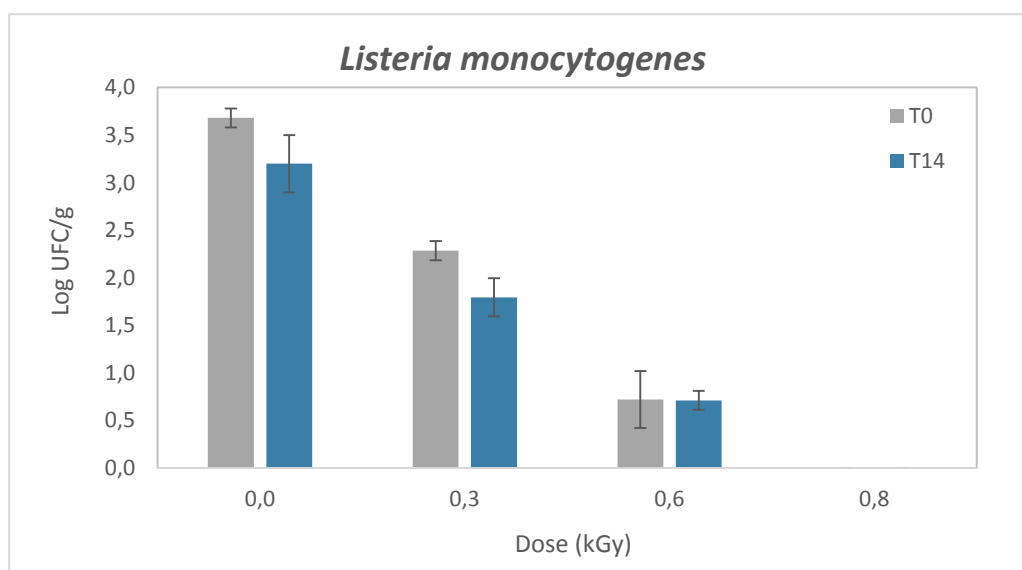
Para ambos os tempos de análise, o D10 de *S. Typhimurium* nos tomates cereja tratados por feixe de electrões foi de 0,84 kGy, valor superior ao obtido para a mesma estirpe (0,3 kGy) nos tomates cereja irradiados com radiação gama (Guerreiro, *et al.*, 2016). Outros autores relataram uma gama de valores de D10 entre 0,26 a 0,39 kGy para *Salmonella* spp. em tomates cortados irradiados também com feixe de electrões (Prakash, Johnson, & Foley, 2007).

A radioresistência de um microrganismo difere entre espécies e também entre estirpes da mesma espécie, dependendo de factores bióticos e abióticos (Cabo Verde, 2018). As diferentes condições de irradiação por feixe de electrões aplicadas neste estudo (condições de anoxia e consequente menor formação de radicais livres), podem justificar a maior radioresistência observada para as populações homogêneas de microrganismos inoculados artificialmente.

### **5.2.3. *Listeria monocytogenes***

A bactéria *Listeria monocytogenes* pode persistir por longos períodos, encontrando-se amplamente distribuída no ambiente, sendo o solo e os alimentos crus potenciais veículos para a listeriose humana. Este microrganismo pode também multiplicar-se em alimentos embalados com atmosfera modificada comprometendo assim a segurança e qualidade dos alimentos (Trigo, *et al.*, 2009).

Tal como para os outros microrganismos testados, observou-se que a bactéria *L. monocytogenes* segue uma cinética de inactivação linear nos tomates cereja irradiados por feixe de electrões. Este microrganismo demonstrou ser mais sensível à radiação ionizante, sendo necessário reduzir as doses de tratamento para ser possível construir a curva de sobrevivência (Figura 5.6). Verificamos assim, que para a dose máxima aplicada de 0,8 kGy não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* para ambos os tempos de análise, T0 e T14. Outros estudos reportaram igualmente esta maior sensibilidade *L. monocytogenes* à radiação ionizante e consequente não detecção em alimentos tratados a doses próximas de 1 kGy (Bari, *et al.*, 2005).



**Figura 5.9:** Curva de sobrevivência por feixe de electrões da *Listeria monocytogenes* em tomates cereja, logo após tratamento (T0) e após 14 dias de armazenamento refrigerado (T14). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de Log UFC/g (n = 18;  $\alpha = 0,05$ ).

A inactivação da população *L. monocytogenes* em tomates por outros métodos de desinfecção tais como, radiação UV, lavagem com água e imersão em dióxido de cloro, indicaram intervalos de redução entre 1,0 a 3,9 log UFC/g (Mukhopadhyay, Ukuku, Juneja, & Fan, 2014) (Sommers, Sites, & Musgrove, 2010).

A radiosensibilidade *L. monocytogenes* é evidenciada no valor de D10 estimado para este microrganismo nos tomates cereja irradiados por feixe de electrões (Tabela 5.3). O armazenamento refrigerado durante 14 dias parece não influenciar o valor de D10 deste microrganismo.

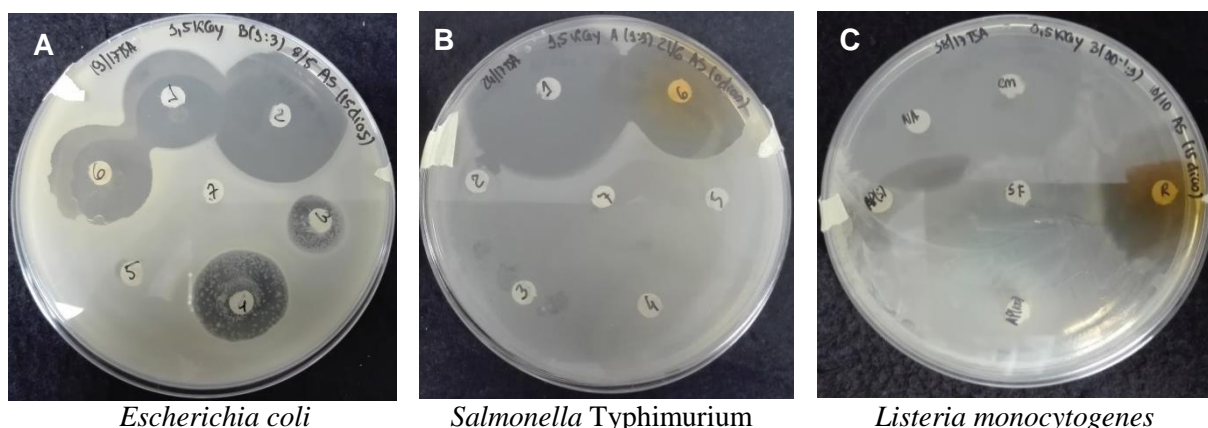
**Tabela 5.3:** Representação do D10 de *L. monocytogenes* para T0 e T14 dias de armazenamento

Tempo	Regressão linear da curva de sobrevivência	R <sup>2</sup>	D10 ± Erro padrão
<b>T0</b>	Log N = -4,93 D + 3,71	0,999	0,20 ± 0,01 kGy
<b>T14</b>	Log N = -4,15 D + 3,14	0,994	0,24 ± 0,01 kGy

Os valores de D10 obtidos para *L. monocytogenes* estão concordantes com os referenciados na literatura para este microrganismo em alimentos (Bari, *et al.*, 2005). Para esta bactéria, a influência dos efeitos abióticos na resposta à radiação ionizante não é evidente como para os outros microrganismos testados, dada a sua elevada sensibilidade à radiação ionizante.

### 5.3. Estudo da sensibilidade a Antibióticos dos isolados bacterianos resultante da inoculação artificial de tomates cereja

A aquisição de resistência a antibióticos de espécies bacterianas potencialmente patogénicas é uma questão emergente para a saúde pública. Embora o objectivo da aplicação do tratamento por radiação ionizante nos alimentos seja como agente letal (a dose de tratamento estabelecida garante a não viabilidade dos microrganismos), a capacidade de mutação das tecnologias de radiação ionizante pode levantar questões de aquisição de resistência a antibióticos para os utilizadores finais. Assim, nesta parte do projecto pretendeu-se efectuar um estudo preliminar sobre o perfil de sensibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos dos tomates cereja contaminados artificialmente, de forma a estimar se o tratamento por feixe de electrões poderá alterar a sensibilidade destes isolados a agentes antimicrobianos, sendo a literatura disponível muito escassa neste tópico. A sensibilidade a diferentes antibióticos (30 µg de Cloranfenicol, 30 µg Ácido Nalidíxico, 10 µg de Ampicilina, 10 µg Bacitracina e 5 µg de Rifampicina) foi avaliada através do método de difusão em agar em isolados de *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogene* recolhidos de tomates cereja não irradiados e irradiados a várias doses, antes e após armazenamento, comparativamente com a cultura pura de referência de cada microrganismo (ver Figura 5.4).



**Figura 5.10:** Exemplo dos antibiogramas efectuados para as estirpes de *Escherichia coli* (A), *Salmonella Typhimurium* (B) e *Listeria monocytogenes* (C).

A estirpe de *E. coli* utilizada indicou ser sensível à Ampicilina e resistente à Bacitracina. (European Committee, 2017). Este perfil de susceptibilidade manteve-se nos isolados deste microrganismo recolhidos dos tomates cereja, sem e com tratamento por feixe de electrões, para os dois períodos de análise (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4:** Halos de inibição de *Escherichia coli* ((S) - Sensível; (R) - Resistente) (Halos medidos em mm)

Antibiótico	Controlo	0 kGy		0.5 kGy		1 kGy	
		T0	T14	T0	T14	T0	T14
<b>Ampicilina (10 µg)</b>	22 (S)	20 (S)	24 (S)	21 (S)	23 (S)	22 (S)	21 (S)
<b>Bacitracina (10 µg)</b>	0(R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)

Relativamente à estirpe de *Salmonella* Typhimurium, demonstrou ser resistente à Ampicilina e Bacitracina, e sensível ao Cloranfenicol e Rifampicina (European Committee, 2017). O tratamento por feixe de electrões e o armazenamento refrigerado não alterou também para este microrganismo o perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados (Tabela 5.5).

**Tabela 5.5: Halos de inibição de *Salmonella enterica* ((S) - Sensível; (R) - Resistente) (Halos medidos em mm)**

Antibiótico	Controlo	0 kGy		0.5 kGy		1 kGy	
		T0	T14	T0	T14	T0	T14
Ampicilina (10 µg)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Bacitracina (10 µg)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Cloranfenicol (30 µg)	38 (S)	43 (S)	46 (S)	35 (S)	38 (S)	40 (S)	42 (S)
Rifampicina (5 µg)	23 (S)	30 (S)	30 (S)	25 (S)	27 (S)	27 (S)	30 (S)

A sensibilidade da bactéria *Listeria monocytogenes* é evidente nos resultados obtidos, indicando ser sensível a todos os antibióticos testados (European Committee, 2017). (Tabela 5.6) O mesmo perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi visível para os isolados não irradiados e irradiados.

**Tabela 5.6: Halos de inibição para os isolados de *Listeria monocytogenes* ((S) - Sensível; (R) - Resistente) (Halos medidos em mm)**

Antibiótico	Controlo	0 kGy		0.3 kGy		0.6 kGy	
		T0	T14	T0	T14	T0	T14
Ampicilina (10 µg)	19 (S)	17 (S)	18 (S)	20 (S)	19 (S)	18 (S)	20 (S)
Cloranfenicol (30 µg)	31 (S)	28 (S)	30 (S)	28 (S)	29 (S)	28 (S)	27 (S)
Ácido Nalidíxico (30 µg)	18 (S)	20 (S)	19 (S)	20 (S)	21 (S)	19 (S)	18 (S)
Rifampicina (5 µg)	31 (S)	27 (S)	26 (S)	27 (S)	30 (S)	27 (S)	30 (S)

Com base nos resultados, o tratamento por feixe de electrões sugere não alterar o perfil de sensibilidade a antibióticos de bactérias potencialmente patogénicas. Resultados semelhantes foram obtidos num estudo com *Bacillus cereus* em alimentos prontos a comer tratados por radiação gama. Os autores concluíram que a sensibilidade a antibióticos da referida bactéria não é afetada pelo tratamento com doses de radiação gama até 10 kGy. (Mtenga, *et al.*, 2012)

## 6. Conclusão

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da utilização da irradiação por feixe de electrões como tratamento pós-colheita de tomate cereja, de forma a assegurar a segurança desta fruta com a potencial extensão do tempo de prateleira.

Os resultados obtidos indicaram que o tratamento por feixe de electrões para uma dose de 3 kGy é eficiente na descontaminação microbiana (aproximadamente 4 log UFC/g  $\approx$  99,99%) pós-colheita dos tomates cereja indicando um potencial aumento do tempo de prateleira deste fruto até 14 dias.

Apesar de ter sido verificada nos tomates cereja uma maior radioresistência das estirpes de *Escherichia coli* ATCC 8739 (D10 de 0,97 kGy) e *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028 (D10 de 0,84 kGy) do que o reportado na literatura para estes microrganismos, aplicando uma dose de tratamento de 3 kGy não foi detectada a presença destes microrganismos nas amostras irradiadas e armazenadas durante 14 dias.

Com base na metodologia aplicada não foi observado nenhum efeito do tratamento por feixe de electrões no perfil de sensibilidade a antibióticos de bactérias potencialmente patogénicas transmitidas por alimentos, tais como *E. coli*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*, mantendo-se o mesmo perfil para os isolados não irradiados e irradiados.

Os resultados obtidos sugerem uma maior eficiência do tratamento utilizando o feixe de electrões para descontaminar tomates cereja relativamente ao tratamento com radiação gama, apresentado também a potencialidade de aumentar o tempo de prateleira dos alimentos.

Em suma, os resultados sugerem que a segurança alimentar dos tomates cereja pode ser assegurada por um tratamento por feixe de electrões com uma dose de 3 kGy. Como trabalho futuro, pretende-se verificar o efeito desta tecnologia nas propriedades organolépticas e bioactivas deste fruto.

## 7. **Bibliografia**

- Adem, E., Angulo-Cervera, E., González-Jiménez, A., Valentín, J., & Marcos-Fernández, A. (2015). Effect of dose and temperature on the physical properties of anali-phatic thermoplastic polyurethane irradiated with an electron beam. *Radiation Physics and Chemistry*, 61–70.
- Agudo, A., Slimani, N., Ocke, M., Naska, A., Miller, A., Kroke, A., . . . Stripp, C. (2002). Consumption of vegetables, fruit and other plant foods in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts from 10 European countries. *Public Health Nutrition*, 1179–1196.
- Aquino, S. (2001). Gamma radiation against toxigenic fungi in food, medicinal and aromatic herbs. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 272-281.
- Authority, E. F., & Control, E. C. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 3991.
- Bari, M. L., NaKauma, M., Todoriki, S., Juneja, V. K., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Effectiveness of Irradiation Treatments in Inactivating *Listeria monocytogenes* on Fresh Vegetables at Refrigeration Temperature. *Journal of Food Protection*, 318–323.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, 82-90.
- Bilek, S. E., & Turantaş, F. (2013). Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 155–162.
- Brilhante São José, J. F., & Dantas Vanetti, M. C. (2012). Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control*, 95-99.
- Castell-Perez, E., Moreno, M., Rodriguez, O., & Moreira, R. (2004). Electron Beam Irradiation Treatment of Cantaloupes: Effect on Product Quality. *Food Sci Tech Int*, 383–390.
- Codex Alimentarius. (10 de 5 de 2017). *codexalimentarius*. Obtido de General standard for the labelling of prepackaged foods.: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/32/CXS\\_001e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/32/CXS_001e.pdf)
- Eufic. (10 de Janeiro de 2012). Obtido em 7 de Março de 2018, de Fruit and vegetable consumption in Europe – do Europeans get enough?: <http://www.eufic.org/en/healthy-living/article/fruit-and-vegetable-consumption-in-europe-do-europeans-get-enough>
- Guerreiro, D., Madureira, J., Silva, T., Melo, R., Santos, P. M., Ferreira, A., . . . Verde, S. C. (2016). Post-harvest treatment of cherry tomatoes by gamma radiation: Microbial and physicochemical parameters evaluation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1–9.
- Holt, J. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.



- Hoog, G., Guarro, J., Gebe, J., & Figueras, M. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*. Schimmecultures: Utrecht.
- José, J. F., Andrade, N. J., Ramos, A. M., Vanetti, M. C., Stringheta, P. C., & Chaves, J. B. (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*, 36-50.
- Lung, H.-M., Cheng, Y.-C., Chang, Y.-H., Huang, H.-W., Yang, B. B., & Wang, C.-Y. (2015). Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, 66-78.
- Martins, C., Behrens, J., Destro, M., Franco, B., Vizeu, D., B.Hutzler, & M.Landgraf. (2004). Gamma radiation in the reduction of *Salmonella* spp. inoculated on minimally processed watercress (*Nasturtium officinalis*). *Radiation Physics and Chemistry*, 87-91.
- Mtenga, A. B., Kassim, N., Lee, W.-G., Shim, W.-B., Yoon, Y., & Chung, D.-H. (2012). Resistance of *Bacillus cereus* and Its Enterotoxin Genes in Ready-to-eat Foods to  $\gamma$ -Irradiation. *Food Sci. Biotechnol.*, 443-452.
- Mukhopadhyay, S., Ukuku, D., Juneja, V., & Fan, X. (2014). Effects of UV-C treatment on inactivation of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on grape tomato surface and stem scars, microbial loads, and quality. *Food Control*, 110-117.
- Neal, J. A., Cabrera-Diaz, E., Lez, M. M.-G., Maxim, J. E., & Castillo, A. (2008). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Baby Spinach, Using Electron Beam Radiation. *Journal of Food Protection*, 2415-2420.
- Pao, S., Kelsey, D. F., Khalid, M. F., & Ettinger, M. R. (2007). Using Aqueous Chlorine Dioxide To Prevent Contamination of Tomatoes with *Salmonella enterica* and *Erwinia carotovora* during Fruit Washing. *Journal of Food Protection*, 629-634.
- Pinheiro, J., Alegria, C., Abreu, M., Gonçalves, E. M., & Silva, C. L. (2015). Use of UV-C postharvest treatment for extending fresh whole tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Zinac) shelf-life. *J Food Sci Technol*, 5066-5074.
- Prakash, A., Johnson, N., & Foley, D. (2007). Irradiation D-values of *Salmonella* spp. in diced tomatoes dipped in 1% calcium chloride. *Foodborne Path. Dis.*, 84-88.
- Raquel, P., & Teixeira, J. (2013). *A produção de tomate industrializado em Portugal*. Aveiro: Universidade de Aveiro.
- Razdan, M. K., & Mattoo, A. K. (2006). *Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2: Tomato*. CRC Press.
- Rees, D., Farrell, G., & Orchard, J. (2012). *Crop Post-Harvest: Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd.
- Roberts, P. B. (2014). Foodirradiationissafe:Halfacenturyofstudies. *Radiation PhysicsandChemistry*, 78-82.

- S. Cabo Verde. Food Irradiation as Sanitary Treatment. *In*: I. C. F. R. Ferreira, A. L. António, S. Cabo Verde (Eds.), Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes. Food Chemistry, Functions and Analysis Series, Royal Society of Chemistry, 2018, pp. 183-207, ISBN: 978-1-78262-708-1.
- Schmidt, H. M., Palekar, M. P., Maxim, J. E., & Castillo, A. (2006). Improving the Microbiological Quality and Safety of Fresh-Cut Tomatoes by Low-Dose Electron Beam Irradiation. *Journal of Food Protection*, 575–581.
- Shi, X., Namvar, A., Kostrznska, M., Hora, R., & Warriner, K. (2007). Persistence and Growth of Different Salmonella Serovars on Pre- and Postharvest Tomatoes. *Journal of Food Protection*, 2725–2731.
- Silindir, M., & Özer, A. Y. (2009). Sterilization Methods and the Comparison of Sterilization Methods and the Comparison of Sterilization. *FABAD J. Pharm. Sci*, 43–53.
- Silverman, G. J. (1983). Sterilization by ionizing radiation. *Em*: S. S. Block (3<sup>a</sup> ed.), Disinfection, sterilization and preservation. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 89-105.
- Sommers, C. H., Sites, J. E., & Musgrove, M. T. (2010). Ultraviolet light (254 NM) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. *Journal of Food Safety*, 470-479.
- Song, H. J., Choi, D., & Song, K. B. (2011). Effect of aqueous chlorine dioxide and UV-C treatment on the microbial reduction and color of cherry tomatoes. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 488–493.
- Soto-Zamora, G., Yahia, E. M., Brecht, J., & Gardea, A. (2005). Effects of postharvest hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit. *LWT- Food Science and Technology*, 657–663.
- Sy, K. V., Murray, M. B., Harrison, M. D., & Beuchat, L. R. (2005). Evaluation of Gaseous Chlorine Dioxide as a Sanitizer for Killing Salmonella, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Yeasts and Molds on Fresh and Fresh-Cut Produce. *Journal of Food Protection*, 1176–1187.
- Trigo, M., Sousa, M., Sapata, M., Ferreira, A., Curado, T., Andrada, L., . . . Veloso, M. (2009). Radiation processing of minimally processed vegetables and aromatic plants. *Radiation Physics and Chemistry*, 659–663.
- TURGIS, M., HAN, J., BORSA, J., & LACROIX, M. (2008). Combined Effect of Natural Essential Oils, Modified Atmosphere Packaging, and Gamma Radiation on the Microbial Growth on Ground Beef. *Journal of Food Protection*, 1237–1243.
- Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., & Zheng, X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*, 234–239.